

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-102188

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)6月6日

C 12 N 15/00
C 07 H 21/04
C 12 N 1/00
5/00

7115-4B
7252-4C
6712-4B
7115-4B

※審査請求 未請求 発明の数 9 (全16頁)

⑮ 発明の名称 DNA

⑯ 特 願 昭59-145878

⑰ 出 願 昭59(1984)7月13日

優先権主張 ⑱ 1983年7月15日 ⑲ スイス(CH) ⑳ 8319265

㉑ 発 明 者 ジョン・マイケル・ロード イギリス国、ウォーリックシャー、レミングトン・スバ、キャンピオン・コート・93

㉒ 発 明 者 フランシス・アイアン・ラム イギリス国、シー・ヴィ・8・2・エイチ・ジエイ、ウォーリックシャー、ケニルワース・ヘンリー・ストリート・76

㉓ 出 願 人 ザ・ユニヴァーシテイ・オブ・ウォーリック イギリス国、シー・ヴィ・4・7・エー・エル、ウエスト・ミッドランズ、カベントリイ(番地なし)

㉔ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発 明 の 名 称

DNA

2. 特許請求の範囲

- (1) リシン-タイプの植物毒素又はその突然変異体の少なくとも実質的な部分をコードしているヌクレオチド配列を含み、生物学的に純粋で且つ均質であることを特徴とするDNA。
- (2) ヌクレオチド配列が成熟毒素のA鎖又はB鎖をコードしていることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のDNA。
- (3) ヌクレオチド配列が、1個又は複数のガラクトース結合部位が除去又は不活化されている突然変異体をコードしていることを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項に記載のDNA。
- (4) 下記ヌクレオチド配列の少なくとも実質的な部分又は遺伝コードの縮重に関して前記ヌ

クレオチド配列と等価なヌクレオチド配列の少なくとも実質的な部分を含むDNAのサンプル。

ATG TAT GCA GTG GCA ACA TGG CTT TGT TTT
GGA TCC ACC TCA GGG TGG TCT TTC ACA TTA GAG
GAT AAC AAC ATA TTC CCC AAA CAA TAC CCA ATT
ATA AAC TTT ACC ACA GCG GGT GCC ACT GTG CAA
AGC TAC ACA AAC TTT ATC AGA GCT GTT CGC GGT
CGT TTA ACA ACT GGA GCT GAT GTG AGA CAT GAT
ATA CCA GTG TTG CCA AAC AGA GTT GGT TTG CCT
ATA AAC GAA CGG TTT ATT TTA GTT GAA CTC TCA
AAT CAT GCA GAG CTT TCT GTT ACA TTA GCC CTG
GAT GTC ACC AAT GCA TAT GTG GTC GGC TAC CGT
GCT GGA AAT AGC GCA TAT TTC TTT CAT CCT GAC
AAT CAG GAA GAT GCA GAA GCA ATC ACT CAT CTT
TTC ACT GAT GTT CAA AAT CGA TAT ACA TTC GCC
TTT GGT GGT AAT TAT GAT AGA CTT GAA CAA CTT
GCT GGT AAT CTG AGA GAA AAT ATC GAG TTG GGA
AAT GGT CCA CTA GAG GAG GCT ATC TCA GCG CTT
TAT TAT TAC AGT ACT GGT GGC ACT CAG CTT CCA
ACT CTG GCT CGT TCC TTT ATA ATT TGC ATC CAA

ATG ATT TCA GAA GCA GCA AGA TTC CAA TAT ATT
 GAG GGA GAA ATG CGC ACG AGA ATT ACG TAC AAC
 CGG AGA TCT GCA CCA GAT CCT AGC GTA ATT ACA
 CTT GAG AAT AGT TGG GGG AGA CTT TCC ACT GCA
 ATT CAA GAG TCT AAC CAA GGA GCC TTT GCT AGT
 CCA ATT CAA CTG CAA AGA CGT AAT GGT TCC AAA
 TTC AGT GTG TAC GAT GTG AGT ATA TTA ATC CCT
 ATC ATA GCT CTC ATG GTG TAT AGA TGC GCA CCT
 CCA CCA TCG TCA CAG TTT TCT TTG CTT ATA AGG
 CCA GTG GTA CCA AAT TTT AAT GCT GAT GTT TGT
 ATG GAT CCT GAG CCC ATA GTG CGT ATC GTA GGT
 CGA AAT GGT CTA TGT GTT GAT GTT AGG GAT GGA
 AGA TTC CAC AAC GGA AAC GCA ATA CAG TTG TGG
 CCA TGC AAG TCT AAT ACA GAT GCA AAT CAG CTC
 TGG ACT TTG AAA AGA GAC AAT ACT ATT CGA TCT
 AAT GGA AAG TGT TTA ACT ACT TAC GGG TAC AGT
 CCG GGA GTC TAT GTG ATG ATC TAT GAT TGC AAT
 ACT GCT GCA ACT GAT GCC ACG CGC TGG CAA ATA
 TGG GAT AAT GGA ACC ATC ATA AAT CCC AGA TCT
 AGT CTA GTT TTA GCA GCG ACA TCA GGG AAC AGT

GAT AAC AAC ATA TTC CCC AAA CAA TAC CCA ATT
 ATA AAC TTT ACC ACA GCG GGT GCC ACT GTG CAA
 AGC TAC ACA AAC TTT ATC AGA GCT GTT CGC GGT
 CGT TTA ACA ACT GGA GCT GAT GTG AGA CAT GAT
 ATA CCA GTG TTG CCA AAC AGA GTT GGT TTG CCT
 ATA AAC CAA CGG TTT ATT TTA GTT GAA CTC TCA
 AAT CAT GCA GAG CTT TCT GTT ACA TTA GCC CTG
 GAT GTC ACC AAT GCA TAT GTG GTC GGC TAC CGT
 GCT GGA AAT AGC GCA TAT TTC TTT CAT CCT GAC
 AAT CAG GAA GAT GCA GAA GCA ATC ACT CAT CTT
 TTC ACT GAT GTT CAA AAT CGA TAT ACA TTC GCC
 TTT GGT GGT AAT TAT GAT AGA CTT GAA CAA CTT
 GCT GGT AAT CTG AGA GAA AAT ATC GAG TTG GGA
 AAT GGT CCA CTA GAG GAG GCT ATC TCA GCG CTT
 TAT TAT TAC AGT ACT GGT GGC ACT CAG CTT CCA
 ACT CTG GCT CGT TCC TTT ATA ATT TGC ATC CAA
 ATG ATT TCA GAA GCA GCA AGA TTC CAA TAT ATT
 GAG GGA GAA ATG CGC ACG AGA ATT AGG TAC AAC
 CGG AGA TCT GCA CCA GAT CCT AGC GTA ATT ACA
 CTT GAG AAT AGT TGG GGG AGA CTT TCC ACT GCA

GGT ACC ACA CTT ACG GTG CAA ACC AAC ATT TAT
 GCC GTT AGT CAA GGT TGG CTT CCT ACT AAT AAT
 ACA CAA CCT TTT GTT ACA ACC ATT GTT GGG CTA
 TAT GGT CTG TGC TTG CAA GCA AAT AGT GGA CAA
 GTA TGG ATA GAG GAC TGT AGC AGT GAA AAG GCT
 GAA CAA CAG TGG GCT CTT TAT GCA GAT GGT TCA
 ATA CGT CCT CAG CAA AAC CGA GAT AAT TGC CTT
 ACA AGT GAT TCT AAT ATA CGG GAA ACA GTT GTT
 AAG ATC CTC TCT TGT GGC CCT GCA TCC TCT GGC
 CAA CGA TGG ATG TTC AAG AAT GAT GGA ACC ATT
 TTA AAT TTG TAT AGT GGA TTG GTG TTA GAT GTG
 AGG CGA TCG GAT CCG AGC CTT AAA CAA ATC ATT
 CTT TAC CCT CTC CAT GGT GAC CCA AAC CAA ATA
 TGG TTA CCA TTA TTT

- (5) 下記ヌクレオチド配列の少なくとも実質的な部分又は遺伝コードの縮重に関して前記ヌクレオチド配列と等価なヌクレオチド配列の少なくとも実質的な部分を含むDNAのサンプル。

ATG TAT GCA GTG GCA ACA TGG CTT TGT TTT
 GGA TCC ACC TCA GGG TGG TCT TTC ACA TTA GAG

ATT CAA GAG TCT AAC CAA GGA GCC TTT GCT AGT
 CCA ATT CAA CTG CAA AGA CGT AAT GGT TCC AAA
 TTC AGT GTG TAC GAT GTG AGT ATA TTA ATC CCT
 ATC ATA GCT CTC ATG GTG TAT AGA TGC GCA CCT
 CCA CCA TCG TCA CAG TTT

- (6) 下記ヌクレオチド配列の少なくとも実質的な部分又は遺伝コードの縮重に関して前記ヌクレオチド配列と等価なヌクレオチド配列の少なくとも実質的な部分を含むDNAのサンプル。

GCT GAT GTT TGT ATG GAT CCT GAG CCC ATA
 GTG CGT ATC GTA GGT CGA AAT GGT CTA TGT GTT
 GAT GTT ACG GAT GGA AGA TTC CAC AAC GGA AAC
 GCA ATA CAG TTG TGG CCA TGC AAG TCT AAT ACA
 GAT GCA AAT CAG CTC TGG ACT TTG AAA AGA GAC
 AAT ACT ATT CGA TCT AAT GGA AAG TGT TTA ACT
 ACT TAC GGG TAC AGT CCG GGA GTC TAT GTG ATG
 ATC TAT GAT TGC AAT ACT GCT GCA ACT GAT GCC
 ACC CGC TGG CAA ATA TGG GAT AAT GGA ACC ATC
 ATA AAT CCC AGA TCT AGT CTA GTT TTA GCA GCG
 ACA TCA GGG AAC AGT GGT ACC ACA CTT ACG GTG

CAA ACC AAC ATT TAT GCC GTT AGT CAA GGT TGG
 CTT CCT ACT AAT AAT ACA CAA CCT TTT GTT ACA
 ACC ATT GTT GGG CTA TAT GGT CTG TGC TTG CAA
 GCA AAT AGT GGA CAA GTA TGG ATA GAG GAC TGT
 AGC AGT GAA AAG GCT GAA CAA CAG TGG GCT CTT
 TAT GCA GAT GGT TCA ATA CGT CCT CAG CAA AAC
 CGA GAT AAT TGC CTT ACA AGT GAT TCT AAT ATA
 CGG GAA ACA GTT GTT AAG ATC CTC TCT TOT GGC
 CCT GCA TCC TCT GGC CAA CGA TGG ATG TTC AAG
 AAT GAT GGA ACC ATT TTA AAT TTG TAT AGT GGA
 TTG GTG TTA GAT GTG AAG CGA TCG GAT CCG AGC
 CTT AAA CAA ATC ATT CTT TAC CCT CTC CAT GGT
 GAC CCA AAC CAA ATA TGG TTA CCA TTA TTT

- (7) 特許請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかで
 定義したヌクレオチド配列をインサートとして含
 むことを特徴とする組換えDNA分子。
- (8) 前記インサートがプラスミド又はバクテリオフ
 ァージであるクローニングベクター中に組み込ま
 れていることを特徴とする特許請求の範囲第7項

ビジアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) であ
 ることを特徴とする特許請求の範囲第10項に
 記載の変容宿主微生物。

- (14) クローニングベクターがpBR322, pAT153,
 pUC8, pGS15及びpMB9から選択されるい
 ずれかの適切なプラスミドであることを特徴と
 する特許請求の範囲第11項に記載の変容宿主
 微生物。
- (15) クローニングベクターがプラスミドpUC6で
 あることを特徴とする特許請求の範囲第12項
 に記載の変容宿主微生物。
- (16) クローニングベクターがpMA91, pMA230,
 YRp7, pLC544又はYEp6であることを特
 徴とする特許請求の範囲第13項に記載の変容
 宿主微生物。
- (17) リシン-タイプの植物毒素の前駆体又はその
 一部をコードしているcDNA配列の生物学的に
 純粋なサンプルを調製する方法であつて、前記

に記載の組換えDNA分子。

- (9) 特許請求の範囲第7項又は第8項に記載の組
 換えDNA分子を含有する変容宿主細胞。
- (10) 宿主が植物細胞、動物細胞、グラム陰性菌、
 グラム陽性菌又は酵母であることを特徴とする
 特許請求の範囲第9項に記載の変容宿主細胞。
- (11) 宿主がグラム陰性菌であり、大腸菌 (*E. coli*),
 メチロフィルス メチロトロプス (*Methylophilus*
methylophilus) 又はアルカリゲネス ユウトロ
 フス (*Alcaligenes eutrophus*) のいずれかで
 あることを特徴とする特許請求の範囲第10項
 に記載の変容宿主微生物。
- (12) 宿主がグラム陰性菌であり、ストレプトマイ
 セス (*Streptomyces*), バチラス (*Bacillus*)
 又はアルスロバクター (*Arthrobacter*) のいづ
 れかであることを特徴とする特許請求の範囲第
 10項に記載の変容宿主微生物。
- (13) 宿主が酵母であり、サッカロマイセス セレ

の如き毒素を産生する植物の組織からmRNAを
 単離し、逆転写によつて前記mRNAからcDNA
 を合成することを特徴とする方法。

- (18) 特許請求の範囲第17項に記載の二本鎖cDNA
 をクローニングベクターに挿入することによつ
 て組換えDNA分子を取得する方法。
- (19) 特許請求の範囲第18項に記載の組換えDNA分
 子を宿主微生物中に導入することを特徴とする
 遺伝的に変容した宿主の取得方法。

(以下余白)

3. 発明の詳細な説明

本発明は、後述する如くリシン型（リシンタイプ）の植物毒素たるポリペプチドの少くとも一部分をコードするヌクレオチド配列を含むDNAに係る。本発明は更に、リシン型の天然植物毒素であるか又は該毒素に近縁のポリペプチドをコードするDNA配列を含む組換DNA分子に係る。リシン、及びそれ以外の植物毒素例えばアブリン、モデシン（modescin）及びビスキュミン（viscumin）は、ジスルフィドブリッジによつて結合された2つのポリペプチド鎖（A鎖及びB鎖として知られている）から成り、1つの鎖（A鎖）は細胞毒性の主因であり、残りの鎖（B鎖）は分子を細胞表面に結合させ得る部位を有する。リシンは *Ricinus communis*（ヒマとして知られる）中で“ブレブロリシン”として知られるタンパク前駆物質を経て産生される。

ブレブロリシンは、リーダー配列を含むポリペ

の毒性を抗腫瘍治療に使用し得るかも知れないことは既に教示されている。即ち、全リシン又は天然リシンの分離A鎖と腫瘍特異的モノクローナル抗体との接合体から成る種々の免疫毒素（immunotoxin）は既に調製されている。これら公知の接合体はかなり有効ではあるが、まだ改良の余地がある。

公知の接合体に関する1つの問題は、天然リシンから得られるA鎖の構造的特徴から生じる。天然リシンのA鎖は合成中に *Ricinus* 細胞中に存在する酵素によつてN-グリコシル化されることが知られており、これにより生じる糖成分は細胞表面との非特異的相互作用が可能であると考えられる。即ち、公知のA鎖接合体は天然B鎖が存在しない場合にも標的以外の細胞と成る程度結合することができ、従つて標的以外の細胞に対する免疫毒素の毒性を増加すると考えられる。

公知のリシンA鎖接合体に関する別の問題は、B鎖がリシン分子を細胞表面に結合せしめるとい

ブチド単鎖を含む。リーダー配列は生体中で除去されてプロリシンを生じ、このプロリシンが次に開裂され、リンカー領域が除去されジスルフィド結合で接合されて成熟タンパクを形成する。

リシン型毒素の毒性は3段階で作用する。即ち、(1) B鎖を介して細胞表面に結合する；(2) 少くともA鎖が細胞質ゾルに浸透する；(3) リボソームの60Sサブユニットを巧撃するA鎖によつてタンパク合成を阻害する。従つて、互いに分離されたA鎖及びB鎖は本質的に無害であり、本来有るA鎖は、B鎖が存在しないと細胞表面に結合する能力をもたない。

また、リシン型毒素に於いては、B鎖はガラクトース認識部位を介して細胞表面に結合することも知られているが、この部位は細胞表面に露出した糖タンパク又は糖脂質と反応する。

腫瘍細胞のみに対する結合能を有する別の担体成分を無差別結合B鎖に置換すると、リシンA鎖

う第一機能以外に中毒プロセスに成る程度関与するという重大な第二機能を有することから発生する。B鎖をモノクローナル抗体の如き別の担体成分で置換すると第二機能が消滅する。

A鎖糖成分と細胞表面との相互作用を阻止し同時にB鎖の毒性増化という第二機能を維持することができれば、全リシン抗体接合体の他常細胞に対する毒性を低減し標的細胞に対する毒性を増加し得、これにより免疫毒素の治療指数を向上させ得るであろう。また、天然リシンB鎖がN-グリコシル化されB鎖の糖成分も非特異的相互作用に寄与し得ることも知られている。更に、双方の鎖の糖成分はリシン分子を肝内の網内細胞によつて隔離することができ、従つて、このような糖成分が維持されたリシン分子の一部又は全部をベースとする薬物の、系からの迅速な排泄が遅延される。

化学的方法又は酵素学的方法によつて天然リシ

ンから糖成分を完全に除去する試みはこれまで成功していない。しかし乍ら、既知の全リシンー抗体接合体の使用に対する主な障害は、リシンB鎖に2つのガラクトース結合部位が存在することである。これらのB鎖ガラクトース結合部位は、特に *in vivo* で使用されたとき、現行の全リシンー抗体接合体の非特異的細胞相互作用の主因となる。天然毒素中にこれらの部位が存在すると、抗体によつて与えられる標的特異性は明らかに除去されるか又は低減する。

リシン又はそれ以外のリシン型植物毒素をベースとしており前記の如き課題が解決された改良免疫毒素は、N-グリコシル化が生じないように且つB鎖がガラクトース認識部位を有していないように修飾されておりしかも二次機能たる中毒促進性を維持している全毒素分子が標的細胞に毒素を送出する組体成分に結合して構成されている。これは、適当なモノクローナル抗体の如く腫瘍特異

的及び／又は細胞／組織特異的のヘビクルになり得る。

リシン自体に的を絞つた出願人等のこれ迄の研究によれば、リシン(及び軽度修飾されたA鎖とB鎖とを有する2つのリシン様分子から成る近縁複集素)の組立ては、別々のmRNAの産生物の如くA鎖とB鎖との別々の合成を含むのではなく、A鎖とB鎖との双方の配列を含む1つのポリペプチド前駆体を先ず形成することが判明した。このことは同じタイプの別の毒素の場合にも当てはまると考えてよい。

本発明は、前記の如きリシン型の毒素の分子、又は、このような毒素分子の一部、又は、(毒素分子自体に変換され得る)前記の如き分子の前駆体を発現し得る微生物を遺伝子操作によつて調製することができるという理論に基く。該毒素分子は前記に教示したように修飾することができ、且つ、該毒素分子を腫瘍特異的又は細胞／組織特異

的モノクローナル抗体又は別の組体成分例えばホルモン又はレクチンと組合せることによつて有効な毒素接合体の構築に使用し得るものである。

リシンが前駆体ポリペプチドを経て形成されるので、リシン前駆体を発現する細胞系を公知技術によつて構築し得るであろう。次に、リシン前駆体産生物を化学的又は酵素学的に所望の修飾リシンに変換し得る。本文中の別のリシン型毒素の場合にも同様の技術を使用し得る。別の技術としては、前駆体をコードするDNA配列からA鎖とB鎖とを別々にコードする2つの配列を分割し、分割されたこれらの配列を異なるクローニングベヒクルに挿入し、得られた組換DNA分子を別々の宿主微生物に挿入する方法である。このような宿主の1つはA鎖ポリペプチド配列を発現し、別の1つはB鎖ポリペプチド配列を発現するであろう。次に、これらの配列が合一して所望の修飾リシン分子を形成し得る。この技術はまた、A鎖及びB

鎖が別々のmRNA遺伝子プールによつてコードされているいかなるリシン型毒素にも使用され得ることは明らかであろう。この方法では、A鎖及びB鎖が別々に発現されるので無毒性である。従つて安全性の見地からこの方法は好ましい。

1つの角度から見ると、本発明はリシン型毒素ポリペプチド又はその突然変異体の前駆体の少くとも一部をコードするヌクレオチド配列を含むDNAの生物学的に純粋で均質なサンプルを提供する。

前記タンパクは好ましくは、成熟タンパクのA鎖又はB鎖を含む。

より詳細には本発明は、以下のDNA配列のいずれかの少くとも実質的な部分を含むか、又は、遺伝コードの縮重に関して該DNA配列に均等のヌクレオチド配列の少くとも一部を含むDNAの生物学的に純粋なサンプルを提供する。該DNA配列は、

- (1) 添付の第1図に示すヌクレオチド配列 -72
~1623、
- (2) 添付の第1図に示すヌクレオチド配列 -72
~801、又は、
- (3) 添付の第1図に示すヌクレオチド配列 838
~1623である。

本発明の別の目的は、本文中に記載の如くリシン型の植物毒素中に存在するポリペプチド配列をコードするDNA配列を含む組換DNA分子を提供することである。

より詳細には、リシン型の植物毒素のA及びB鎖の前駆体ポリペプチドをコードするDNA配列を含む組換DNA分子が提供される。

又は、リシン型の植物毒素のA鎖又はB鎖のいずれかの少くとも一部をコードするDNA配列を含む組換DNA分子が提供される。

本発明の別の目的は、前記の如き組換DNA分子を含む遺伝的に変容された宿主微生物を提供す

ることである。

本発明の組換DNA分子に於いて、B鎖をコードするヌクレオチド配列はガラクトース結合部位を除去又は失活するように修飾され得、前駆体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列従つて成熟タンパク中のヌクレオチド配列はガラクトース結合部位を除去又は失活するように修飾され得、N-グリコシル化シグナルをコードする配列は、該シグナルを無効又は除去するように修飾され得る。このために有用な技術の例として欠失又はオリゴヌクレオチド媒介突然変異がある。

宿主生物は植物細胞又は動物細胞又は微生物のいずれでもよく微生物が好ましい。

微生物は原核生物又は真核生物のいずれでもよい。原核生物の例としては、グラム陰性菌、例えば、*E. coli*, *Methylophilus methylotrophus* 及び *Alcaligenes eutrophus*、並びに、グラム陽性菌、例えば、*Streptomyces*, *Bacillus subtilis* 及び *Arthrobacter*

がある。真核生物の例として酵母、例えば *Saccharomyces cerevisiae* がある。

組換DNA分子は、リシン型植物毒素の前駆体ポリペプチドの少くとも一部又はA鎖もしくはB鎖の少くとも一部をコードするDNA配列が挿入されたプラスミド又はファージベクターの如きクローニングベクターを含み得る。

クローニングベクターとしてはプラスミドが好ましいがファージベクターの使用も可能である。プラスミドは自然産プラスミドでもよく、又は好ましくは別のプラスミドの断片から誘導された混成材料でもよい。混成プラスミドを使用するときは、該プラスミドがリシン遺伝子の発現を改良するプロモータ配列を含むのが好ましい。

クローニングベヒクルとして使用され得る適当なプラスミドの例として、特に、グラム陰性菌には pBR322, pAT153, pUC8, pGSS15 及び pMB9 があり、グラム陽性菌には pVC6 があり、

S. cerevisiae には pMA91, pMA230, YRp7, pLC544 及び YEp6 がある。ベクターは予定した特定宿主に適するように選択されるであろう。

本発明は更に、組換DNA分子を得るための方法を提供する。本発明方法は、リシン型植物毒素中に存在するポリペプチド配列をコードする二本鎖DNA配列を調製しこの二本鎖DNA配列をクローニングベクターに挿入するステップを含む。

より詳細にはこのような方法は、リシンA及びB鎖前駆体ポリペプチドをコードするmRNAを単離し、逆転写酵素と適当なプライマーとを用いて前記mRNAから単鎖cDNAを合成し、DNAポリメラーゼとB1ヌクレアーゼとを順次用いて前記第一鎖から形成された鎖型に第二DNA鎖を組合せ、得られた二本鎖cDNAをクローニングベクターに挿入するステップを含む。

又は、mRNAから組立てられたcDNAをリシン分子の別々の部分例えばA鎖及びB鎖を夫々

コードする別々の部分に切断し、これらの部分を次に別々のクローニングベクターに挿入してもよい。

前記の如くクローニングベクターは好ましくは pBR322, pAT153 又は pUC8 の如きプラスミドであり、このプラスミドを、制限エンドヌクレアーゼ PstI によつて開裂し、オリゴ(dG)テイルをつなぎ、オリゴ(dC)テイルがつながれた二本鎖cDNAとアニールし得る。

本発明は更に、本発明の組換えDNA分子を適当な宿主微生物に導入するステップを含む変容された形質転換宿主の製法を提供する。

クローニング用宿主として使用される微生物は好ましくはグラム陰性菌、より好ましくは E. coli である。

クローニング後、リシン前駆体(又は前駆体から形成される別のリシン型要素の前駆体)をコードするDNA配列を宿主クローニングベクターか

ら除去し得る。次にこの前駆体を海分子の別々の領域例えばA鎖及びB鎖をコードする2つの部分に分割し、これらの部分を別の第2クローニングベクターに挿入し、得られた新しい組換えDNA分子の各々を用いて新しい宿主を変容してもよい。又は、全体を第2のクローニングベクターに導入してもよい。第2のクローニングベクターは適当なプロモータ配列を含んでおり、全コード配列又はその一部の第2クローニングベクターへの挿入の位置と方向とは、新しい組換えDNA分子を適当な宿主微生物例えば E. coli 又は S. cerevisiae に導入した際に所望遺伝子の配列が得られるように選択される。

以下では、リシンA及びB鎖前駆体ポリペプチドをコードするDNA配列を含有する形質転換宿主の調製について、先ず概略を説明し、次に詳細を説明する。このプロセスは添付の第2図に要約されている。

先ず、この前駆体をコードするmRNAをショ糖濃度勾配遠心法で公知の如く濃縮した。逆転写酵素を用い、公知手順でこのmRNAと、対応する単鎖cDNAを単鎖形に合わせ、³²P-末端ラベルしたmRNAのポリアデニル化3'-末端に結合するオリゴ(dT)をプライマーとして使用しmRNAに先ず増殖点を設けた。この反応直後の産物はDNA-RNAハイブリッドである。加水分解し単鎖DNAを完全形(intact)で残してRNA鎖を除去する。これを遊離ヌクレオチドの存在下でDNAポリメラーゼを用いて二本鎖形に変換するとヘアピン形分子が得られる。この分子の彎曲端を次に単鎖特異的ヌクレアーゼS1で除去する。次に得られた二本鎖cDNAに対し、ターミナルトランスフェラーゼを用いてオリゴ(dC)テイルをつなぎ、小分子除去又はその逆のためにサイズ分画し、PstIで開裂しターミナルトランスフェラーゼを用いてオリゴ(dG)テイルをつないでおいたpBR322又はpAT153

ベクターとアニールする。DNA塩基上のシトシンテイルはベクター上のグアニンテイルと対合する。

リシン前駆体ポリペプチドをコードするDNAセグメントを含有する得られたキメラXプラスミドを用いて次に E. coli DH1細胞を形質転換し、キメラプラスミドの存在を、テトラサイクリン耐性でアンピシリン感受性を示す細胞の選択によつて確認した。1600をこえるTet^r, Amp^r クロオンが得られた。各クロオンから誘導されたコロニーをニトロセルロースフィルターに移し、所望DNA配列を含むクロオンを、³²P-末端ラベルした20merオリゴヌクレオチドプローブを用いて同定した。このプローブはDNA配列

ACCTACAA^AGTT^CTT^CCT^AGCC

を有しており、相補配列TGGATGTT^TAA^GAA^TGAC^TGG^Gを含むDNAにハイブリダイズする。リシン前駆

体ポリペプチドはアミノ酸配列-Trp-Met-Phe-Lys-Asn-Asp-Gly-を含むことが知見されて^いるで、この因となるDNA配列は前出の後の方の遺伝コードであることがわかる。

例えば、Singer-Sam 等 (1983), Proc. Natl. Acad. Sci (米国), 80巻, 802-806頁、に記載の如き適当なハイブリダイゼーション条件及び洗浄条件を用いて、所望DNA配列を含む80個のプラスのクローンを選択し、これらのクローンのうちからプラスミドpBR322中で最大のクローン8個を先ず選出して以後の特性決定に用いた。ヒマレクテンに対するこれらクローンの関係をハイブリッド放出翻訳アッセイ (hybrid release translation assay) を用いて確認した。前記の8個のクローンから、夫々1614, 1950, 1059及び1020塩基対の4つのクローンを選出して配列決定に用いた。

詳細には、形質転換宿主を以下の如く調製した。

るまで3M NaAc, pH 5.5中でペレットを繰返し洗った。最終ペレットを300mM NaClに溶解し、前記同様に沈殿した。

ポリ(A)テイルを担うmRNA分子をオリゴ(dT)-セルロースのアフィニティークロマトグラフィーで抽出した。400mM NaCl, 20mM トリス-HCl, pH 7.6, 0.2% SDS中室温で30分間ハイブリダイゼーション後、ビーズをペレット化し、前記パツファ中で3回次いで200mM NaCl, 20mM トリス-HCl, pH 7.6, 0.1% SDS中で2回洗った。スラリーをカラムに注ぎ、溶出液の A_{260} がバックグラウンドレベルになるまで最終パツファで更に洗った。次に、20mM トリス-HCl, pH 7.6を用いて50℃でポリ(A)含有RNAを溶出した。溶出液をISCO連続流UVセル (continuous flow UV cell) でモニタした。倍容の-20℃の低温エタノールを加えて200mM NaClからポリ(A)含有RNAを1晩沈殿させ、次に、70%エタ

A. cDNA合成

1. mRNAの抽出及び分画

100-200gの熟成 *Ricinus* 種子を液体窒素中で凍結粉砕して粉末にし、50mM トリス-HCl, pH 9, 150mM NaCl, 5mM EDTA 及び5% SDS中でWaring ブレンダーで1乃至2分ホモゲナイズした。均質液を等容のフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し相を遠心して分離した。有機相と残渣とを0.5倍容の20mM トリス-HCl, pH 9.0と2mM EDTAとによりつて再抽出し、得られた水相を最初の水相と合一した。合一した水相を界面に物質が存在しなくなるまで等容のフェノール:クロロホルムで繰返し再抽出した。200mMのNaCl溶液にしてから倍容の低温エタノールを加えてRNAを沈殿させた。

-20℃で1晩沈殿後、MSE18又はMSE21遠心機で10,000rpmで30分間遠心した。エタノール沈殿による上清中に多糖が検出されなくな

ノールで3回洗い、10mM トリス-HCl, pH 7.0に約1μg/μLまで再溶解した。

mRNAを65℃で2分間加熱し急冷した。100mM トリス-HCl, pH 7.5, 0.5% SDS, 1mM EDTA中の10-30%リボスクレアーゼ不含シヨ糖 (Sigma) 濃度勾配の一番上に約400μgのポリ(A)⁺RNAの層をのせ、SW27ロータを用いたBeckman L5-65B遠心機で25,000rpmで17℃で14時間遠心した。連続流UVセルを用いるISCO濃度勾配分画装置で400μLの画分を収集した。

各画分をNaCl中で200mMにし、液体窒素中で凍結-解凍を3回行なつて倍容の低温エタノールと共に沈殿させ、Eppendorf マイクロ遠心機で4℃で30分間遠心して回収し、70%のエタノールで1回洗浄し、10μLの10mM トリス-HCl, pH 7.0に再溶解した。各画分から得た部分サンプル(1μL)を網状赤血球溶解剤無細胞系で

翻訳し、レクチン前駆体を免疫沈殿してレクチン mRNA に富む画分を同定した。

2. 第一鎖合成

50 mM トリス-HCl, pH 8.3 と 10 mM $MgCl_2$ と 100 mM KCl と 1 mM dATP, dTTP 及び dGTP と 250 μ M dCTP と 0.06 μ g/ μ L オリゴ(dT)₁₂₋₁₈ と 10 mM DTT と 0.4 ユニット/ μ L の逆転写酵素との存在中で、分画したポリ(A)⁺ RNA を 0.5 μ g/ μ L で逆転写した。この逆転写酵素は鳥類骨髄芽球症ウイルスから得られたものである。(³H) dCTP 又は α -(³²P) dCTP を適宜反応に含ませた。

反応混合物を 42℃ で 4.5 分間インキュベートし、ここで等容の 5 mM トリス-HCl, pH 8.3 と 5 mM DTT と 250 μ M dCTP とを同量の前記酵素と共に加えた。更に 45℃ で 4.5 分間インキュベートして反応を継続し凍結によつて反応を停止した。第二鎖と S₁ スクレアーゼとの反応産物と

共に 1% 変性アガロースゲルで部分サンプルを分析した。

3. 第二鎖合成

第一鎖反応物を 3 分間沸騰させ急速に冷却して mRNA-cDNA ハイブリッドを変性した。Eppendorf マイクロ遠心機で不溶物質を 2 分間ベレット化し、上清を冷えた新しい管に移した。標準反応のためにすでに存在している変性に関わり無く以下の試薬を添加した。dATP, dGTP 及び dTTP を 100 μ M まで。Hepes-KOH, pH 6.9 を 105 mM まで。KCl を 92 mM まで。適宜ラベルされた dCTP を 80 μ M まで。及び 0.1 ユニット/ μ L の DNA ポリメラーゼ。反応を 20℃ で 6 時間進行させ、ここで、10 mM トリス-HCl, pH 7.6 と 20 mM の NaCl と 1 mM の EDTA との中での 1 ml の Bio-Gel P60 カラムでゲル濾過して cDNA を混合物から除去した。Cerenkov 又は液体シンチレーションカウンティングで画分をモニターし、

ピークを除いた画分をブールし、倍容の低温エタノールを加えて 0.3 M NaAc, pH 6 から沈殿させた。Eppendorf マイクロ遠心機で低温で 30 分間遠心分離して沈殿物を回収し、約 2.5 μ g/ μ L の RNA-当量になるまで水に溶解した。

4. S₁ スクレアーゼ消化

二本鎖 cDNA の単鎖領域を、300 mM NaCl と 30 mM の NaAc, pH 4.5 と 3 mM の $ZnCl_2$ との存在下で *Aspergillus oryzae* からの S₁ スクレアーゼで消化した。37℃ で 15 分間及び 15℃ で 15 分間順次インキュベートして反応を継続し、トリス-HCl, pH 7.6 を 130 mM まで及び EDTA を 10 mM まで加えて反応を停止した。次に、等容のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (2.5 : 2.4 : 1) で抽出し、倍容の低温エタノールで 300 mM NaAc, pH 6 から沈殿させた。沈殿物を 0.25 μ g/ μ L RNA 当量になるまで 10 mM トリス-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA に溶解

した。

5. DNA へのホモポリマーテイルの付加

140 mM のカコジル酸カリウム, pH 7.6 と 30 mM トリス塩基と 0.1 mM DTT と 1 mM $CoCl_2$ と ^{75-150 倍過剰量の} (³H) 又は (³²P) をラベルした dCTP との存在中で、0.001-0.01 μ g/ μ L の dCTP とターミナルトランスフェラーゼを用いて、二本鎖 DNA の 3' 末端に ~~75-150 倍過剰量の~~ dC テイルをつないだ。反応を 37℃ で 6 分間行なった。Brays scintillant でカウントして総放射能に対する TCA 不溶放射能の割合を測定しラベルが収められた程度を追跡した。

冷却し EDTA を 10 mM まで加えて反応を停止し、収められなかつた物質を前記の如きゲル濾過で除去した。テイルの付いた cDNA を前記同様に沈殿させ、1 M NaAc, pH 8 と 10 mM トリス-酢酸塩, pH 8 と 1 mM EDTA とに溶解し、分画処理に備えた。

dGTPをdCTPに代えて^明Pat I 開裂 pBR322 DNAを同様に処理した。

6. テイルの付いたcDNAの分離

cDNAを、1M NaAc, pH 8 と 10mM トリス-酢酸塩, pH 8 と 1mM EDTA との中の5-20%直線シロ糖濃度勾配で分離し、SW50.1ロータ中で39,000rpmで1晩遠心した。pBR322 DNAのHinf I及びPat I消化物の混合物を充填した並列勾配でDNA沈降を検査し、この勾配の画分を1%中性アグロースゲルに流した。cDNA勾配からの画分を等容の水で希釈し、倍容の低温エタノールで沈殿させ、次にブールして3つの最終画分を得た。即ち(2,200bpより大きい)大cDNA画分と(1,000-2,200bp)の中間画分と(600-1,000bp)の小さいcDNAを含む画分とを得た。600bp未満のcDNA分子は廃棄した。

3つの最終画分を、150mM RbClと10mM

1mlを25mlの同じ培地に接種し、 $A_{550}=0.48$ まで増殖させた。次に細胞を15分間氷冷し4℃のMSE21遠心機で5,000rpmで5分間処理して回収した。次に、10mlの100mM RbCl, 50mM $MgCl_2$, 10mM $CaCl_2$, 35mM NaAc, pH 6.8, 15%グリセロールに再懸濁させ氷上に15分間維持した。

細胞を再度回収し、1mlの10mM RbClと75mM $CaCl_2$ と10mM MOPS-KOH, pH 5.8と、15%グリセロールと共に再懸濁させ、更に15分間氷上に維持した。

このように調製された細胞100μlをアニールしたDNAサンプルと混合し、氷上で30分間インキュベートし、次に42℃で90-120秒間熱衝撃を与えた。1mlのpsiプロスを加え、細胞を37℃で1時間増殖させた。次に細胞を速く遠心し、100μlのpsiプロスに再懸濁させ、14μg/mlのテトラサイクリンを含むLBプレートに

トリス-HCl, pH 7.6と0.2mM EDTAと共に約5ng/μlになるように溶解した。

B. アニール及び形質転換

1. アニール

dC-テイル付きcDNAをほぼ等モル比のdG-テイル付きpBR322又はpAT153と0.4ng/μlのベクター濃度で混合した。パンプは前記と同じである。混合物を70℃で30分間加熱し、次に1晩室温に放冷し、徐々に4℃に冷却した。受容細胞(competent cells)を加え以下の如く形質転換した。

2. 受容細胞の調製及び形質転換

DH1細胞(recA1, nalA, r_k^- , m_k^+ , $endo1^-$, R^- , relA1?)を10mlのpsiプロス培地(2%トリプトン, 0.5%酵母抽出物, 10mM NaCl, 20mM $MgCl_2$, KOHでpH 7.6に調整、いずれもDifcoの細菌学的試薬)で増殖させ、37℃の振盪水浴中で $A_{550}=0.3$ まで増殖させた。次にその

プレートした。(LBは、1%トリプトン, 0.5%酵母抽出物, 170mM NaCl, 1.5%酪素から成る)。

37℃で18-24時間増殖後、コロニーを計数し33μg/mlのアンプシリンを含むLBプレートに塗抹して、環再形成プラスミド又は非開裂プラスミドを含む形質転換体を同定した。1600より多いTet^rAmp^rクローンを採取し、14μg/mlテトラサイクリンを含む大きいLBプレートに順序正しい列状に移した。

C. スクリーニング

1. オリゴヌクレオチドのラベル付け

リンシンB類特異的オリゴマ(20mer)の末端をポリヌクレオチドキナーゼを用いてラベルした。50mM トリス, pH 8.5と10mM $MgCl_2$ と5mM DTTと0.1mM スベルミジン-HClと0.1mM EDTAとの中で500ngのオリゴヌクレオチドを60μCi γ -(³²P)ATPと1μlのポリヌクレオチ

ドキナーゼ (Boehringer) と共に 37℃ で 35 分間インキュベートした。等容の 0.6M NH_4Ac を加えて反応を停止し、0.14M NaCl と 0.02M トリス、pH 7.6 と 0.005M EDTA と 0.1% SDS との中でセファデックス G 25 カラムに通して取込まれなかった rATP のバルクを除去した。プローブを -20℃ で冷凍保存した。

2. オリゴヌクレオチドプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション

テトラサイクリンを加えた LB 上に重層したニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell 0.45 μ) で形質転換体を増殖した。3 組のフィルターを 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含む 37℃ の LB-Tet プレートに 16 時間を要して移した。0.5M NaOH で浸らせた 3mm の 2 枚の紙シートにフィルターのコロニー側を合せて室温で 15 分間維持した。また、(1) 1M トリス、pH 8.0 及び (2) 1M トリス、pH 8 と 1.5M NaCl (30 分間) を

用いて同じ手順で洗った。フィルターを空気乾燥し 80℃ で乾燥した。

二重シールポリテンバッグでプレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションとを行なった。0.9M NaCl と 0.09M トリス、pH 7.4 と 0.006M EDTA と 0.5% NP40 と 2× Denhardt と 0.2% SDS と 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性単鎖サケ精子 DNA と 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の tRNA との中でフィルターをプレハイブリダイズした。プレハイブリダイゼーションを 55℃ で 4 時間行なった。次に、プレハイブリダイゼーションバッファをバッグから絞り出し、50 ng のラベルしたプローブを含む新しいバッファを (最大バッファ濃度 5 ng/ml になるまで) 加えた。アニーリングを 37℃ で 1 晩維持した。

室温の 6×SSC で軽く洗った。6×SSC を 4 回交換して 3 時間を要してフィルターを洗った。次に 3 組のフィルターを、塩基組成とプローブの

不整合度とに基づいて決定した 3 つの別々の温度で洗った。プローブ中の A 又は T に 2℃、C 又は G に 4℃ を用い洗浄温度を 52℃、56℃ 及び 60℃ に選択した。フィルターを 6×SSC 中で厳密な温度で 10 分間洗い、次に完全に乾燥した。フィルターを X 線フィルムに 1 晩露光した。

D. ハイブリッド選択手順

1. DNA 結合

プラスのクローン (群) から得たプラスミド DNA を精製し、10乃至15 μg を EcoRI で直線化した。フェノール：クロロホルム抽出とエタノール沈殿とを行なつてから、ペレットを 0.5 ml の 0.1×SSC に溶解した。次に、0.5 ml の 1M NaOH を加え、混合物を室温で 15 分間静置した。予冷した 4 ml の中和溶液 (1.5M NaCl , 0.25M HCl, 0.25M トリス-Cl, pH 8.0) を加え、浸らせた Schleicher 及び Schuell の 0.45 μ フィルターディスクを含む swinnless で 5 ml の DNA サンプ

ルを減圧吸引した。次に、5 ml の 6×SSC をフィルター (群) に通した。これらを空気乾燥し次に 80℃ で 2 時間乾燥した。

2. ハイブリッド選択プロトコル

フィルター (群) を 5 ml の容器に入れ、50% ホルムアミドと 0.4M NaCl と 10mM PIPES-NaOH, pH 6.4 と 4mM EDTA と 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tRNA と 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ボリ(A) との中で 41℃ で 4 時間プレハイブリダイズした。バッファを除去し、フィルター (群) を一般には約 20 μg のヒマ由米ボリ(A)⁺ RNA を含む (上記) 50% ホルムアミドバッファ中で 41℃ で 1 晩ハイブリダイズした。バッファを除去しフィルター (群) を、(1) 室温の 1×SSC、0.5% SDS、(2) 室温の 0.1×SSC、0.1% SDS、(3) 50℃ の 0.1×SSC、0.1% SDS、(4) 室温の 0.1×SSC、0.1% SDS の各々を 2 回ずつ用いて 15 分間ずつ洗った。フィルター (群) を脱水し、200 μL のハイブリッ

ド遊離バッファ (90%ホルムアミド, 10mM PIPES-NaOH, pH 6.4, 1mM EDTA, 0.5% SDS) を各フィルターに加え、40℃で30分間かき混ぜた。バッファを新しいEppendorf へ移し、NaCl を0.2Mまで加えた。遊離したmRNAをエタノールで沈殿させ、70%エタノールで数回ゆすぎ、乾燥させて5μl無菌水に溶解した。サンプルを網状赤血球溶解物無細胞系で翻訳し、産生物をSDS-ポリアクリルアミドゲルに直接流すか、又は最初に適当な抗血清で免疫沈降した。

本文中で以後pBRCL6及びpBRCL17(RCL=Ricinus communis lectin)と指称される前記の2つのクローンの前記リシン前駆体ポリペプチドをコードするDNA配列を、Sangerジデオキシ法 (Sanger等、1977-Proc. Natl. Acad. Sci. 米国 74, 5463-67)とMaxam-Gilbert法 (Maxam and Gilbert, 1980-Meth. Enzym. 65, 499-560)とを組合せて決定した。各インサートの末端の配

列を決定するために、インサートをPat Iを用いてpBR322から切除し、Pat I直線化、ホスファターゼ処理プラスミドpUC8に結合した (Vieria and Messing, 1982-Gene 19, 259-268)。これらの組換プラスミドによつてE. coli DH I細胞を形質転換した。これらの新しい組換プラスミドを本文中で以後pRCL6及びpRCL17と指称する。

2つのインサートは共通配列領域を含んでおり、合して完全リシン前駆体配列を示すと考えられる。pRCL6及びpRCL17中でインサートのオーバーラップ領域のヌクレオチドは完全に等しい。

次に、リシン前駆体ポリペプチドをコードする完全ヌクレオチド配列を含む新しい組換DNA分子を構築した。このために、制限エンドヌクレアーゼSau 961で消化してpRCL17から長さ323bpの断片を単離し、Sau 961で部分消化してpRCL6から単離した長さ1561bpの断片

に結合した。50mM トリスHCl (pH 7.4)と10mM MgCl₂と10mM ジチオトレイトールと1mM スペルミジンと10mM ATPと0.1mg/ml BSAとに5ユニットの市販T4 DNA リガーゼを加えた液中で結合を生じさせ、15℃で1晩インキュベートした。標準フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿とを行なった後、結合DNAをベレット化し、少量の10mM トリスHCl (pH 7.4)と1mM EDTAとに溶解し、Pat Iで完全消化した。得られた直線状DNAを次に、同量のPat I直線化、ホスファターゼ処理pUC8と(前記の如く)結合した。リシン前駆体の完全DNA配列を含む新しい組換DNA分子をpRCL617と命名し、これを従来同様に用いてE. coli DH I細胞を形質転換した。

pRCL617のヌクレオチド配列を第1図に示す。

この配列はクローンpRCL6及びpRCL17中の2つのオーバーラップDNAインサートから推

定された(これら2つのクローンの各々のDNAインサートの範囲を以下に説明する)。

ヌクレオチド残基に対し5'→3'方向に番号をつける。但し、成熟リシンA鎖のアミノ末端残基を特定するコドンの第1残基の番号を1とし、残基1の5'側のヌクレオチドにはマイナス番号をつけた。5'末端配列はmRNAの5'端まで伸びていないが、図示の3'末端配列に27個の残基から成るポリ(dA)トラクトが続いており、これは領域の完全配列を示す。ヌクレオチド配列の下側に予想アミノ酸配列を示し、そのF側に文献に発表された成熟リシンA鎖及びB鎖のアミノ酸配列との違いを示す。(G. Funatsu, M. Kimura 及び M. Funatsu, Agric. Biol. Chem. 43巻, 2221-2224ページ (1979), 及び, S. Yoshitake, G. Funatsu 及び M. Funatsu, Agric. Biol. Chem. 42巻, 1267-1274ページ (1978))。発表されたアミノ酸配列に無い残基には破線でアンダーラインを付け、

発表された配列には存在したがここで推定された配列に無いアミノ酸の位置は星印で示した。A鎖のC末端とB鎖のN末端とを連結する12個のアミノ酸配列の下側の点線はかつこで括つた。成熟A鎖のアミノ末端残基からアミノ酸番号をつけ、その手前の残基はマイナス番号で示す。アスバラギン結合N-グリコシル化が可能な部位を横線で囲み、可能なポリ(A)シグナルにアンダーラインを引く。pRCL6のインサートはヌクレオチドゲ-102から残基1512まで伸びておりpRCL17のインサートはヌクレオチド733から残基1782まで伸びている。

12個の媒介トリプレットは、前駆体ポリペプチド中に存在しており細胞中で酵素により除去されてA鎖とB鎖とを分離するリンカーアミノ酸配列をコードする。A鎖及びB鎖は、リシン分子自体の形成中にジスルフィドブリッジにより接合される。このリンカー領域と予定されたアミノ末端

リーダー又はシグナル配列(アミノ酸-24→-1)とはFunatsu等によつて発表された配列中には存在しない。

ブレブロリシンは前記DNAインサートによりコードされた完全ポリペプチド即ちアミノ酸-24からアミノ酸541までのポリペプチドである。ブロリシンは生体中でブレブロリシンからアミノ酸リーダー配列が除去されて得られたものでアミノ酸1からアミノ酸541まで伸びている。

4. 図面の簡単な説明

第1図はpRCL617のヌクレオチド配列とブレブロリシンのアミノ酸配列を示す図であり、第2図はcDNAの合成及びクローニング過程を示す説明図である。

出願人 ヤマハ・エンジニアリング・カンパニー・リミテッド
代理人 弁護士 川 口 義 雄
代理人 カミヤ 今 村 元

図面の浄書(内容に変更なし)

5'-AACCGGCGG GAATACTAT TGTATATGG ATG TAT GCA GTG GCA ACA TGG CTT Met Tyr Ala Val Ala Thr Trp Leu	-50
TTC TTT GGA TCC ACC TCA GGG TGG TCT TTC ACA TTA GAG GAT AAC AAT ATA Cys Phe Gly Ser Thr Ser Phe Thr Thr Leu Glu Asp Asn Ile	-20
TGT TTT GGA TCC ACC TCA GGG TGG TCT TTC ACA TTA GAG GAT AAC AAT ATA Cys Phe Gly Ser Thr Ser Phe Thr Thr Leu Glu Asp Asn Ile	-10
TTC CCC AAA CAA CAA TAC CCA ATT ATA AAC TTT ACC ACA GCG GGT GCG ACT GTG Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Ile Ile <u>Asn Phe Thr</u> Thr Ala Gly Ala Thr Val	10
CAA AGC TAC ACA AAC TTT ATC AGA GCT GTT GCG GGT TTA ACA ACT GGA Gln Ser Tyr Thr Asn Phe Ile Arg Ala Val Arg Gly Arg Leu Thr Thr Gly	20
GCT GAT GTG AGA CAT GAT ATA CCA GTG TTG CCA AAC ACA GGT GGT TTG CCT Ala Asp Val Arg His Asp Ile Pro Val Leu Pro Asn Arg Val Gly Leu Pro	30
ATA AAC CAA CCG TTT ATT TTA GTT GAA CTC TCA AAT CAT GCA GAG CTT TCT Ile Asn Gln Arg Phe Ile Leu Val Glu Leu Ser Asn His Ala Glu Leu Ser	40
GTT ACA TTA GCG CTG GAT GTC ACC AAT GCA TAT GTG GTC GCG TAC CGT GCT Val Thr Leu Leu Ala Leu Asp Val Thr Asn Ala Tyr Val Val Gly Tyr Arg Ala	50
GCA AAT AGC GCA TAT TTC TTT CAT CCT GAC AAT CAG GAA GAT GCA GAA GCA Gly Asn Ser Ala Tyr Phe His Pro Asp Asn Gln Glu Asp Ala Glu Ala	60
ATC ACT CAT CTT TTC ACT GAT GAT CAA AAT CCA TAT ACA TTC GCG TTT GGT Ile Thr His Leu Phe Thr	70

第1図 (その1)

400
GGT AAT TAT GAT AGA CTT CAA CAA CTT GGT AAT CTG AGA GAA AAT ATC
Gly Asn Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Leu Ala Gly Asn Leu Arg Glu Asn Ile
130

450
GAG TTG CGA AAT GGT CCA CTA GAG GAG GCT ATC TCA CGC CTT TAT TAT TAC
Glu Leu Gly Asn Gly Pro Leu Glu Ala Ile Ser Ala Leu Tyr Tyr Tyr
140 150

500
ACT ACT GGT GGC ACT CAG CTT CCA ACT CTG GCT TCC TTC ATA ATT TGC
Ser Thr Gly Gly Thr Gln Leu Pro Thr Leu Ala Arg Ser Phe Ile Ile Cys
160 170

550
ATC CAA ATG ATT TCA GAA GCA GCA AGA TTC CAA TAT ATT GAG GGA GAA ATG
Ile Gln Met Ile Ser Glu Ala Ala Arg Phe Gln Tyr Ile Glu Gly Glu Met
180

600
CGC ACG AGA ATT ACG TAC AAC CCG AGA TCT GCA CAA GAT CCT AGC GTA ATT
Arg Thr Arg Ile Arg Tyr Asn Arg Arg Ser Ala Pro Asp Pro Ser Val Ile
190

650
ACA CTT GAG AAT AGT TGG GGG AGA CTT TCC ACT GCA ATT CAA GAG TCT AAC
Thr Leu Glu Asn Ser Trp Gly Arg Leu Ser Thr Ala Ile Gln Glu Ser Asn
210 220

700
CAA GGA GGC TTT GCT AGT CCA ATT CAA CTG CAA ACA CGT AAT GCT TCC AAA
Gln Gly Ala Phe Ala Ser Pro Ile Gln Leu Gln Arg Arg [Asn Gly Ser] Lys
230 --- Asp

750
TTC AGT GTG TAC GAT GTG AGT ATA TTA ATC CCT ATC ATA GCT CTC ATG GTG
Phe Ser Val Tyr Asp Val Ser Ile Leu Ile Pro Ile Ile Ala Leu Met Val
240 250

800
TAT AGA TGC GCA CCT CCA CCA TGC TCA CAG TTT TCT TTG CTT ATA AGC CCA
Tyr Arg Cys Ala CCG CCG CCA CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG
260

850
GTG GTA CCA AAT TTT AAT GGT TGT ATG GAT CCT GAG CCC ATA GTG
Val Val Val Pro Asn Phe Asn Ala Asp Val Cys Met Asp Pro Glu Pro Ile Val
280 ---)280

900
CGT ATC GTA GGT CGA AAT GGT CTA TGT GTT GAT GTT AGG GAT GGA AGA TTC
Arg Ile Val Gly Arg Asn Gly Leu Cys Val Asp Val Arg Asp Gly Arg Phe
300 Asn

950
CAC AAC GCA AAC GCA ATA CAG TTG TGG CCA TCC AAG TCT AAT ACA GAT GCA
His Asn Gly Asn Ala Ile Gln Leu Trp Pro Cys Lys Ser Asn Thr Asp Ala
310 320

1000
AAT CAG CTC TGC ACT TTG AAA AGA GAC AAT ACT ATT CCA TCT AAT GCA AAG
Asn Gln Leu Trp Thr Leu Lys Arg Asp Asn Thr Ile Arg Ser Asn Gly Lys
330 340

1050
TGT TTA ACT ACT TAC GGG TAC AGT CCG GGA GTC TAT GTG ATG ATC TAT GAT
Cys Leu Thr Thr Tyr Gly Tyr Ser Pro Gly Val Tyr Val Met Ile Tyr Asp
Pro Ser

1100
TGC AAT ACT GCT GCA ACT GAT GCC ACC CCG TGG CAA ATA TGG GAT
Cys Asn Thr Ala Ala Thr Asp Ala Thr Arg Trp Gln Ile Trp Asp
360 Thr Asn

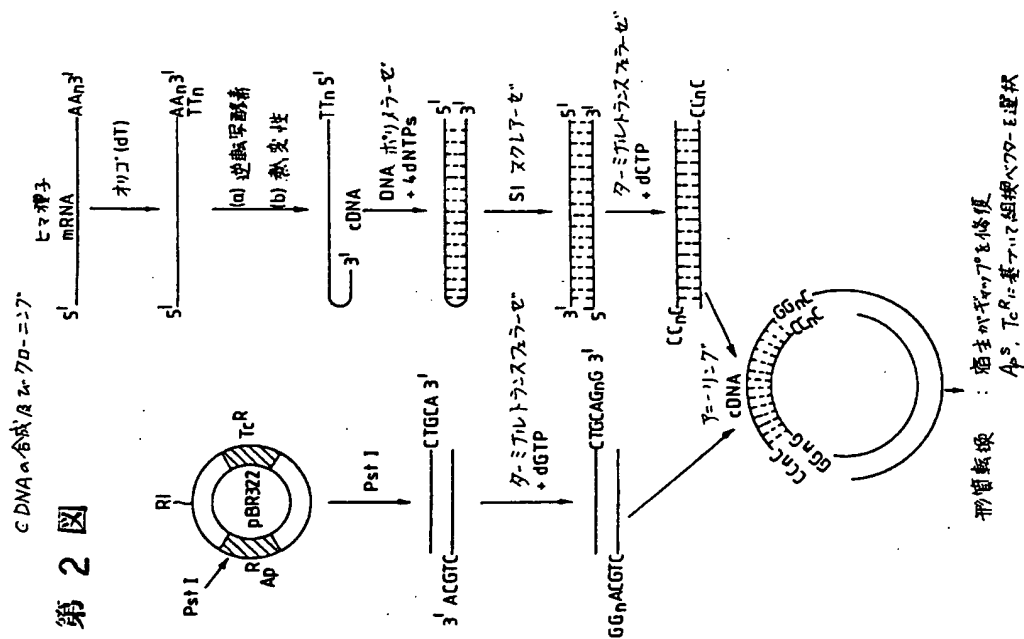
1150
AAT GGA ACC ATC ATA AAT CCC AGA TCT AGT CTA GTT TTA GCA GCG ACA TCA
[Asn Gly Thr] Ile Ile Asn 380 390

1200
GGG AAC AGT GGT ACC ACA CTT ACG GTG CAA ACC AAC AAT TAT GCC GTT AGT
Gly Asn Ser Gly Thr Thr Leu Thr Val Gln Thr Asn Ile Tyr Ala Val Ser
400

1250
CAA GGT TGG CTT CCT ACT AAT AAT ACA CAA CTT GTT ACA ACC ATT GTT
Gln Gly Trp Leu Pro Thr [Asn Asn Thr] Gln Pro Phe Val Thr Thr Ile Val
420

第1図(No.2)

第1圖(43)



形質転換 : 宿主がゲノム上を修復
 A_p , T_c^R : 基質として組換

1300
GGG CTA TAT GGT CTG TGC TTA CAA GCA AAT AGT GGA CAA GTA TGG ATA GAG
Gly Leu Tyr Gly Leu Cys Leu Gln Ala Asn Ser Gly Gln Val Trp Ile Glu Val 430

1350
GAC TGT AOC AGT GAA AAG GCT GAA CAA CAG TGG GCT CTT TAT GCA GAT GGT
Asp Cys Ser Ser Glu Lys Ala Glu Gln Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Asp Gly Ser 450

1400
TCA ATA CGT CCT CAG CAA AAC CGA GAT AAT TGC CTT ACA AGT GAT TCT TAT
Ser Ile Arg Pro Gln Gln Asn Arg Asp Asn Cys Leu Thr Ser Asp Ser Asn 470

1450
ATA CGG GAA ACA GTT GTT ANG ATC CTC TCT TGT GGC CCT GCA TCC TCT GCC
Ile Arg Glu Thr Val Val Lys Ile Leu Ser Cys Gly Pro Ala Ser Ser Gly 490

1500
CAA CGA TGG ATG TTC ANG AAT GAT GAC ACC ACC ATT TTA AAT TTG TAT AGT GCA
Gln Arg Trp Met Phe Lys Asn Asp Gly Thr Ile Leu Asn Leu Tyr Ser Gly 500

1550
TTG GTG TTA GAT GTG AGG CGA TCG GAT CCG AGC CTT AAA CAA ATC ATT CTT
Leu Val Leu Asp Val Arg Arg Ser Asp Pro Ser Leu Lys Gln Ile Ile Leu 510

1600
TAC CTT CTC CAT GGT GAC CCA AAC CAA ATA TGG TTA CCA TTA TTT TGA
Tyr Pro Leu His Gly Asp Pro Asn Gln Ile Trp Leu Pro Leu Phe 520

1650
TACAGCAGTT ACTCTCTGTC AGTGTGTGTC TCTGCCATG AAGATAGATG GCTTAATATA
1700

1750
AAGGACATT GTAAATTTTG TACTGGAAG GACAGCAAGT TATTCAGTC CAGTACTTA
1800

1850
TAAGGACAA ACTATTGCTT TGTGCATTCT AATTT-Poly(A)

第1図 (γ_{04})

第1頁の続き

⑨Int.Cl.	識別記号	庁内整理番号
// C 07 K 13/00		6464-4H
(C 12 N 1/00		
(C 12 R 1:01)		
(C 12 N 1/00		
(C 12 R 1:19)		
(C 12 N 1/00		
(C 12 R 1:465)		
(C 12 N 1/00		
(C 12 R 1:07)		
(C 12 N 1/00		
(C 12 R 1:06)		
(C 12 N 1/00		
C 12 R 1:865)		

優先権主張 ⑩1984年3月13日⑩イギリス(GB)⑩8406569
 ⑦発明者 リン・マーガレット・ イギリス国、ウォーリックシャー、レミングタン・スバ、
 ロバーツ リリントン、プレイマー・ロード・48

手続補正書(方式)

昭和59年11月27日

特許庁長官 志賀 学園



1. 事件の表示 昭和59年特許願第145878号

2. 発明の名称 D N A

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ザ・ユニヴァーシティ・オブ・ウォーリック

4. 代理人 東京都新宿区新宿 1丁目 1番14号 山田ビル

(郵便番号 160) 電話(03) 354-8623

(6200) 弁理士 川口 毅



5. 補正指令の日付 昭和59年10月9日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象 図面

8. 補正の内容 濃墨を用いて適正な川紙に鮮明に描いた適正な

図面を別紙の通り補正する (内容に変更なし)

